

Preparation method of mannuronic acid with single degree of polymerization and its application

Publication number: CN1341665
Publication date: 2002-03-27
Inventor: GUAN HUASHI (CN); LIU YAN (CN); JIANG XIAOLU (CN)
Applicant: QINGDAO UNIV OF OCEANOGRAPHY (CN)
Classification:
- **international:** **C08B37/00; C08B37/00;** (IPC1-7): C08B37/00
- **europaen:**
Application number: CN20001011368 20000907
Priority number(s): CN20001011368 20000907

[Report a data error here](#)

Abstract of **CN1341665**

The preparation method of mannuronic acid with single polymerization degree includes the following steps: dissolving sodium alginate in water, adding algin lyase to make reaction, heating with boiling water bath to deactivate lyase, centrifugalizing and removing precipitate impurity, regulating pH value of the obtained solution, centrifugalizing and removing produced precipitate, using alkali liquor to dissolve and regulating pH value, adding ethyl alcohol to produce precipitate, drying and using ion exchange chromatographic column to make separation, using eluent to make elution. It is characterized by that the pH regulation range of the above-mentioned solution is 2.5-3.2, eluent is a gradient one of sodium acetate, and the described enzyme is a specific algin lyase produced by vibrio. Said invented product possesses antitumor activity, can be used for developing antitumor medicine.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00111368.2

[43] 公开日 2002 年 3 月 27 日

[11] 公开号 CN 1341665A

[22] 申请日 2000.9.7 [21] 申请号 00111368.2

[71] 申请人 青岛海洋大学

地址 266003 山东省青岛市鱼山路 5 号

[72] 发明人 管华诗 刘 岩 江晓路

[74] 专利代理机构 青岛海昊专利事务所

代理人 崔清晨

权利要求书 1 页 说明书 2 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 单一聚合度的甘露糖醛酸的制备方法及应用

[57] 摘要

一种单一聚合度的甘露糖醛酸的制备方法,包括使褐藻酸钠溶于水,加入褐藻胶裂合酶进行反应,用沸水浴加热使酶失活,离心后除去沉淀杂质,将溶液调 pH,离心除去产生的沉淀物,用碱液溶解并调 pH,加入乙醇产生沉淀,干燥后用离子交换色谱柱进行分离,用洗脱液洗脱,其特征是所述的将溶液的调 pH 范围为 2.5 ~ 3.2,所述的洗脱液为醋酸钠的梯度洗脱液,所述的酶是由弧菌产生的专一性褐藻胶裂合酶。本产品是具有抗肿瘤活性,用于开发抗肿瘤药物。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种单一聚合度的甘露糖醛酸的制备方法，包括使褐藻酸钠溶于水，加入褐藻胶裂合酶进行反应，用沸水浴加热使酶失活，离心后除去沉淀杂质，将溶液调 pH，离心除去产生的沉淀物，用碱液溶解并调 pH，加入乙醇产生沉淀，干燥后用离子交换色谱柱分离各单一聚合度的甘露糖醛酸混合物，将甘露糖醛酸混合物用洗脱液洗脱，分步收集洗脱液组分，分别加入乙醇进行沉淀，脱盐后冻干，其特征是所述的将溶液调 pH 的范围为 2.5~3.2，所述的洗脱液为醋酸钠的梯度洗脱液，所述的酶是由弧菌产生的专一性褐藻胶裂合酶。

2 一种单一聚合度的甘露糖醛酸，其特征是具有抗肿瘤活性，用于开发抗肿瘤药物。

3 如权利要求 1 所述的方法，其特征是所述的甘露糖醛酸的单一聚合度分别为 2~12。



说明书

单一聚合度的甘露糖醛酸的制备方法及应用

本发明涉及一种有机聚合物，特别是涉及一种具有抗肿瘤活性的单一聚合度的甘露糖醛酸。

在一日本专利:(06172375)中公开了一种用鲍鱼丙酮粉提取物制备甘露糖醛酸的方法，该鲍鱼丙酮粉提取物中含有甘露糖醛酸裂合酶。这是一种应用酸水解和酶解制备聚合度 2~7 的寡聚甘露糖醛酸的方法，其分离效果不佳。

本发明的目的是提供一种制备过程简单，分离效果好的单一聚合度的甘露糖醛酸的制备方法，并且该产品具有抗肿瘤活性，可用于开发抗肿瘤药物。

一种单一聚合度的甘露糖醛酸的制备方法，包括使褐藻酸钠溶于水，加入褐藻胶裂合酶进行反应，用沸水浴加热使酶失活，离心后除去沉淀杂质，将溶液调 pH，离心除去产生的沉淀物，用碱液溶解并调 pH，加入乙醇产生沉淀，干燥后用离子交换色谱柱分离各单一聚合度的甘露糖醛酸混合物，将甘露糖醛酸混合物用洗脱液洗脱，分步收集洗脱液组分，分别加入乙醇进行沉淀，脱盐后冻干，其特征是所述的将溶液调 pH 范围为 2.5~3.2，所述的洗脱液为醋酸钠的梯度洗脱液，所用褐藻胶裂合酶是由弧菌产生的。

一种单一聚合度的甘露糖醛酸，其特征是具有抗肿瘤活性，用于开发抗肿瘤药物。

本发明的制备方法分离效率高，制出的各种单一聚合度的甘露糖醛酸具有不同程度的抗肿瘤活性，可用于开发成抗肿瘤药物。

下面通过实施例说明本发明。

取 5g 褐藻酸钠溶于 100ml 水，加入 5 单位（褐藻胶裂合酶的酶活力单位为每 min 使 0.2% 的褐藻胶溶液吸光度增加 1 所需的酶量为一个酶活单位。）由弧菌产生的褐藻胶裂合酶液，该酶的生产方法已在 00111178.7 号在先申请中叙述过了。在 28℃ 下反应，直到 230nm 吸光值不再变化，然后沸水浴加热使酶失活，冷却后离心去杂质，将上清液调 pH2.85，离心去掉沉淀，用 4mol/L 的 NaOH 调 pH 到 7，加入乙醇使产品沉淀，干燥后得到不同聚合度的甘露糖醛酸混合物。用 Q-sepharose fast flow 阴离子交换色谱柱分离各单一聚合度的甘露糖醛酸。色谱柱先用 0.1mol/L pH7.5 的醋酸钠缓冲液起始洗脱液平衡好，再将 1g 上述制备的甘露糖醛酸溶于起始缓冲液上色谱柱，用 0.1~1 的醋酸钠梯

度洗脱液洗脱，用 230nm 的紫外检测器检测洗脱下来的甘露糖醛酸含量，分步收集各洗脱组分，脱盐后分别加入乙醇沉淀出甘露糖醛酸，干燥后得到 2~12 不同聚合度的甘露糖醛酸。

采用本方法可以制备出聚合度为 2~12 的甘露糖醛酸。这些寡糖用高效阴离子交换色谱 (high performance anion exchange chromatography HPAEC) 检测为单峰，说明为单一聚合度。

用噻唑蓝 (TTM) 实验方法测定了用本发明的方法制备的各单一聚合度的甘露糖醛酸的抗肿瘤活性。实验时将癌细胞以 10% 小牛血清 (FCS) 的 RPMI1640 培养基配成 10^4 个/ml 悬液，于 37℃，5%CO₂，100 μ l/孔 (96 孔板) 抚育 24h，各组对应加三聚甘露糖醛酸，使其浓度分别为 1，10，100ug/ml，空白组对应加培养基，每组 5 个平行孔，培养 24h 后加入 5mg/ml 的 TTM 20ul，培养 4h，去上清液加 150ul 二甲基亚砷 (DMSO)，用酶标仪测定 570nm，(630nm 为设定波长) 吸光值。所用的癌细胞株为 Ovar-3 人卵巢癌细胞。用此方法测得三聚甘露糖醛酸 100ug/ml 的剂量时的抑瘤率为 18.6%。其他各种聚合度的甘露糖醛酸也以此方法测定了抑瘤率，其结果类似。